

# MIŠJE MONOKLONSKO ANTITELO SPECIFIČNO ZA KAPA LANAC HUMANIH IMUNOGLOBULINA I MOGUĆNOSTI NJEGOVE PRIMENE

Aleksandra B. Inić-Kanada<sup>1</sup>, Marijana M. Stojanović<sup>1</sup>, Saša S. Šeatović<sup>1</sup>, Irena P. Živković<sup>1</sup>, Ratko M. Jankov<sup>2</sup>, Snežana T. Živančević-Simonović<sup>3</sup> i Ljiljana A. Dimitrijević<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za imunologiju i virusologiju "Torlak", Beograd; <sup>2</sup>Hemijski fakultet, Beograd

<sup>3</sup>Institut za Patološku fiziologiju, Medicinski fakultet u Kragujevcu, Kragujevac

## THE MURINE MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR HUMAN KAPPA IMMUNOGLOBULINE CHAIN AND ITS APPLICATION POSSIBILITIES

Aleksandra B. Inić-Kanada<sup>1</sup>, Marijana M. Stojanović<sup>1</sup>, Saša S. Šeatović<sup>1</sup>, Irena P. Živković<sup>1</sup>, Ratko M. Jankov<sup>2</sup>, Snežana T. Živančević-Simonović<sup>3</sup> and Ljiljana A. Dimitrijević<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Virology Torlak, Belgrade; <sup>2</sup>Faculty of Chemistry, Belgrade

<sup>3</sup>Institute of Pathophysiology, School of Medicine, Kragujevac

Primljen/Received: 22. 03. 2002.

Prihvaćen/Accepted: 29. 05. 2002.

### ABSTRACT

Monoclonal antibodies (MoAb) are usually produced as the secretion products of cloned B lymphoblastoid cell lines. Advantages of MoAbs are that they could be selected to have desired specificity and produced in relatively large quantities of consistent quality and characteristics. Interest in the production of reagents specific for human kappa ( $\kappa$ ) chain can be explained by the fact that many pathological conditions are accompanied by frequency of immunoglobulins with  $\kappa$  light chain. The aim of this study was production of stable MoAb-secreting hybridoma with ability to secrete immunoglobulin specific for human  $\kappa$  chain, immunochemical characterization of this MoAb and its possible application. Murine monoclonal antibody, assigned as MoAt 44, produced by hybridoma technology is specific for human kappa chain and fully immunochemically characterized. In this paper, we reported that MoAb 44 demonstrated excellent properties in most immunochemical techniques (immunoblot, dot-blot, immunofluorescence, double and radial immunodiffusion, immunoelectrophoresis...), which highly recommend this MoAb for the application as a tool for research and immunodiagnosics.

**Key words:** Monoclonal antibody, kappa light chain, hybridoma technology, immunodiagnosics

### SAŽETAK

Monoklonska antitela (MoAt) su sekretorni proizvodi kloniranih B ćelijskih limfoblastoidnih linija. Od poliklonskih antitela ih razlikuje: definisana specifičnost vezivanja, homogenost i mogućnost proizvodnje u velikoj količini. Budući da su brojna patološka stanja povezana sa sekrecijom imunoglobulina u čijem sastavu se nalazi kapa ( $\kappa$ ) tip lakog lanca, proizvodnja specifičnih monoklonskih antitela našla bi svoje mesto u njihovoj dijagnostici. Stoga je cilj našeg rada bio dobijanje stabilnog mišjeg hibridomskog klona koji bi sekretovao MoAt specifično za humani  $\kappa$  lanac, imunoheimijska karakterizacija tog MoAt i ispitivanje mogućnosti njegove primene. Mišje monoklonsko antitelo, označeno kao MoAt 44, proizvedeno hibridomskom tehnologijom, specifično je za  $\kappa$  lanac humanih imunoglobulina i u potpunosti imunoheimijski okarakterisano. MoAt 44 može da se koristi u većini imunoheimijskih tehnika (imunoblot-u, dot-blot-u, imunofluorescenci, dvostrukoj i radijalnoj imunodifuziji, imuno elektroforezi...), što omogućava njegovu primenu u naučno-istraživačkom radu i imunodijagnostici.

**Ključne reči:** Monoklonsko antitelo, kapa lanac, hibridomska tehnologija, imunodijagnostika

### UVOD

Proteklo je već više od 20 godina od kada su Cesar Milstein i Georges Kohler iznenadili svet biologije otkrićem monoklonskih antitela (MoAt) (1,2). Danas se već slobodno može reći da su MoAt unapredila bioheimijska istraživanja, a njihova upotreba postala je nezamenljiva u modernoj imunologiji, kao i brojnim drugim naučnim disciplinama koje se bave istraživanjima na molekulskom nivou. Definisan specifičnost monoklonskih antitela omogućava njihovu primenu u strukturnim i funkcionalnim ispitivanjima brojnih ćelija (3,4,5), proteina (6) i nukleinskih kiselina (7). Osim u istraživanjima, MoAt se danas koriste i u dijagnostici i terapiji, kao i u praćenju toka bolesti i efekata terapije autoimunskih, hematoloških i malignih bolesti (8,9). I na kraju, mogućnost primene MoAt kao specifičnih bioregulatora imunskog sistema svrstava ih u kategoriju moćnih sredstava za manipulaciju u okviru imunskog sistema.

Hibridomska tehnologija je bila prva metoda koja je stvorila mogućnost dobijanja neograničene količine anti-

tela identične specifičnosti i željenih karakteristika. Proizvodnja, karakterizacija i primena MoAt postala je već rutinski posao u mnogim laboratorijama i intenzivno se primenjuje, uprkos razvoju novih tehnologija, baziranih, pre svega, na metodima genetskog inženjeringa (10).

Osnovni razlozi za proizvodnju MoAt specifičnih za imunoglobuline (Ig) je mogućnost njihovog korišćenja u detekciji i kvantifikaciji, kako normalnih tako i patoloških imunoglobulina. Činjenica da je u brojnim patološkim stanjima zastupljen  $\kappa$  tip lakog imunoglobulinskog lanca, objašnjava interes za produkciju anti- $\kappa$  specifičnih MoAt, stoga je i cilj našeg rada bio dobijanje MoAt specifičnog za humani  $\kappa$  lanac. Iako se smatra da je neoplastična transformacija klona B limfocita slučajna proces i da zastupljenost tipa lakih lanaca paraproteina (kapa i lambda) odražava njihovu fiziološku zastupljenost u okviru serumskih imunoglobulina (11), kod paraproteina su zapažena izvesna, ponekad vrlo upadljiva odstupanja kapa/lambda odnosa u poređenju sa njihovom zastuplenošću u okviru normalnih imunoglobulinskih izotipova.

Korespondencija:  
Dr Ljiljana Dimitrijević, Viši naučni saradnik  
Odeljenje za istraživanje i razvoj  
Institut za imunologiju i virusologiju "Torlak"  
Vojvode Stepe 458, 11152 Beograd  
tel: +381 11 3975 501  
e-mail: ljiljad@eunet.yu

Korespondence:  
Ljiljana Dimitrijević, MD, PhD  
Department of Research and Development  
Institute of Immunology and Virology Torlak  
458 Vojvode Stepe, 11152 Belgrade  
Phone: +381 11 3975 501  
e-mail: ljiljad@eunet.yu

Pored toga, pokazano je da su paraproteini  $\kappa$  tipa češći u malignim, nego u benignim monoklonskim gamapatijama (12), a otkrivanje slobodnih lakih lanaca u serumu ima veliki značaj u praćenju monoklonskih gamopatija, jer odražava aktivnost bolesti i ukazuje na njenu prognozu (13).

U ovom radu, prikazana je proizvodnja i karakterizacija monoklonskog antitela, nazvanog MoAt 44, koje je specifično za  $\kappa$  lanac humanih imunoglobulina. Dobijeni rezultati preporučuju ovo MoAt kao reagens za istraživanje i dijagnostiku.

## MATERIJAL I METODE

### Imunoblot

Nakon završene elektroforeze uzorci su preneti na nitrocelulozu (NC) po postupku koji je preporučio proizvođač (Manual-Pharmacia). Po završetku transfera blot je razvijen na sledeći način: slobodna mesta na NC-i blokirana su sa 3% BSA u PBS-u, preko noći, pri temperaturi od 4°C i u vlažnoj atmosferi. NC je isprana sa rastvorom 0,05% TWEEN 20 u PBS-u 2 puta i 1 put PBS-om. Nakon inkubacije sa MoAt 44 obeleženim biotinom, na sobnoj temperaturi tokom 2 časa, NC je isprana 2 puta 0,05% TWEEN 20 u PBS-u i 1 put PBS-om, a zatim inkubirana sa streptavidin alkalnom fosfatazom, 1 čas na sobnoj temperaturi. Zatim je NC isprana 2 puta rastvorom 0,05% TWEEN 20 u PBS-u, i još 2 puta PBS-om, nakon čega je dodat supstrat za alkalnu fosfatazu (44  $\mu$ l NBT, 33  $\mu$ l BCIP u 10 ml pufera (Tris 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 0,05M, NaCl 0,1M, pH 9,5), a inkubacija na sobnoj temperaturi i u mraku, trajala je sve dok se ne razvije boja. Reakcija je prekinuta dodavanjem pufera za prekidanje reakcije (TrisHCl 0,02M, EDTA 0,005M, pH 7,5), a membrana nakon ispiranja vodom osušena (14).

### Dot-blot

Nitrocelulozne konfete potopljene su tokom 5 minuta u destilovanu vodu, osušene tokom 10 minuta i potom pažljivo, bez dodirivanja stavljene u bazenčice mikrotitranske ploče, a na njih je nanet 1 ml rastvora Ag/TBS, 1mg/ml. Saturacija je izvršena sa 3% BSA/PBS, 1h na 37°C. Nakon ispiranja, 2 puta sa 0,05% Tween 20/PBS i 1 put PBS-om i inkubacije u rastvoru MoAt 44 (5mg/ml) u 1% BSA/PBS, tokom 1h na sobnoj temperaturi, ponovljeno je ispiranje istim rastvorom. Zatim je dodat rastvor streptavidin-alkalna fosfataza u 1% BSA/PBS, inkubiran 1 čas na sobnoj temperaturi i ponovljeno je ispiranje. Nakon inkubacije u rastvoru 4-hlor-naftola konfete su isprane vodom i osušene.

### Imunofluorescenca

Uzorak krvi (2-3 puta razblažen u PBS-u) centrifugiran je na fikolu u odnosu 1:2,5, 20 minuta, na 1600 rpm, pri 18°C. Izdvojene ćelije su četiri puta oprane PBS-om, centrifugiranjem tokom 5 minuta, na 1100 rpm. Talog je resuspendovan u 1 ml hladnog medijuma RPMI/10% FCS (na 4°C). U precipitinske epruvete razliveno je po 100  $\mu$ l (1-2x10<sup>6</sup>) ćelija kojima je potom dodata odgovarajuća zapremina antitela obeleženih FITC-om (5-10  $\mu$ l At-FITC) i sve je inkubirano tokom 30 minuta na ledu.

Nakon centrifugiranja odliven je supernatant, a talog ispran u 1 ml RPMI/10% FCS, tokom 5 minuta na 1100 rpm i još jednom u 1 ml PBS-a, tokom 5 minuta, na 1100 rpm. Talog je resuspendovan u 200  $\mu$ l PBS-a, a potom je u epruvete lagano dodato po 2 ml ledenog 70% etanola i inkubirano 30 minuta pri 4°C. Ćelije su istaložene centrifugiranjem, 5 minuta na 1500 rpm, odliven je supernatant, a ćelije resuspendovane u 800  $\mu$ l PBS-a. Na kraju je dodato po 100  $\mu$ l rastvora RNAze (1mg/ml) i PJ (400  $\mu$ l/ml) i inkubirano tokom 30 minuta na temperaturi od 37°C.

### Dvosmerna imunodifuzija (DID)

Na gelu, debljine 1-2 mm za analitičke, a 3mm za preparativne svrhe, pripremljeni su bazeni (2-3mm široki, na rastojanju od 1cm). U bazene je uneto 10-15  $\mu$ l rastvora At, a u cilju izolovanja imunoprecipitata u kanaliće je uneto po 400-500  $\mu$ l rastvora At. Nakon 72-časovne difuzije u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi, gelove su 5 puta sušeni filter papirom i rehidrirani PBS-om, a potom još dva puta vodom. Analitički gelovi su u dehidriranom obliku potapani 5 minuta u rastvor boje (0,5% CBB u 45% metanolu, sa 10% sirćetne kiseline), a potom odbojavani sirćetnom kiselinom.

### Radikalna imunodifuzija (RID)

U bazene pripremljene u agaroznom gelu uneto je po 10  $\mu$ l rastvora IgM RD-a. Nakon 72-časovne difuzije u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi, gelovi su isprani, bojeni i odbojeni analogno sa DID.

### Imunoelektroforeza

U 1% agaroznom gelu (u tris-barbituratnom puferu pH 8,6) debljine 1 mm razlivenom na mikroskopsku pločicu pripremljeni su bazeni u blizini katodne strane. Između bazena (paralelno pravcu u kome će se vršiti elektroforetska separacija) prosečen je kanal, iz koga se gel ne uklanja pre završetka elektroforeze. U bazene je uneto po 2  $\mu$ l antigena, a elektroforeza, pri naponu od 15V/cm i na 10°C trajala je 1h. Nakon elektroforeze i uklanjanja gela iz kanala u isti je uneto 100  $\mu$ l antiseruma, a pločica je ostavljena u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi tokom 15h. Na kraju su gelovi isprani, obojeni i uklonjen višak boje analogno sa DID.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Dobijanje i karakterizacija MoAt 44

Hibridom 44 dobijen je fuzijom mišje mijelomske ćeljske linije X63.Ag8.653 i slezinskih limfocita BALB/c miša imunizovanog smesom dva humana monoklonska IgM-a. Nakon dobijanja sekretornog hibridomskog klon-a napravljen je ascit i korišćen za izolovanje i karakterizaciju antitela. MoAt 44 izolovano je afinitetnom hromatografijom na Protein A-Sefaroza CL-4B koloni, kao i gel filtracijom antitela prethodno istaloženih amonijum sulfatom.

Dobijeno MoAt imunohemijski je okarakterisano ELISA testom, elektroforezom i Western blotom, kao i izoelektrofokusanjem i dvostrukom imunodifuzijom. Na SDS-PAGE elektroforezi, pod neredukcionim uslovima, MoAt 44 pokazalo je jednu traku, a njegova pI vrednost, određena izoelektrofokusanjem, iznosila je 7,3. Dvo-

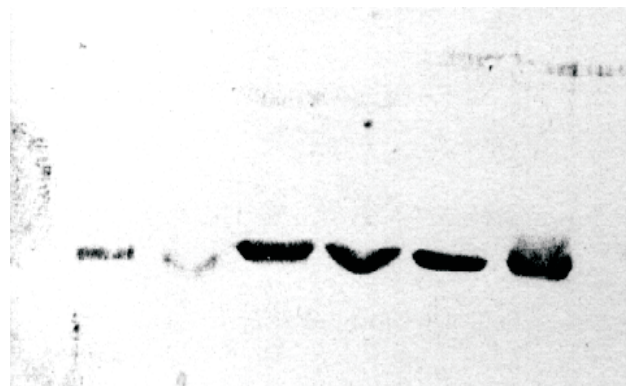
strukom imunodifuzijom, korišćenjem monospecifičnih anti-mišijih Ig anti-seruma pokazano je da MoAt 44 pripada IgG1 potklasi. Izolovano MoAt, prečišćeno i obeleženo biotinom, u ELISA testu i Western blotu, specifično prepoznaje humani  $\kappa$  lanac u okviru IgG, IgM i IgA molekula, kao i slobodan  $\kappa$  lanac. MoAt 44 reaguje sa  $\kappa$  lancem na Western blotu nakon SDS- PAGE, što znači da najverovatnije prepoznaje sekvencioni tip epitopa. MoAt 44 nije krosreaktivno sa  $\kappa$  lancima drugih vrsta.

### Primena MoAt 44

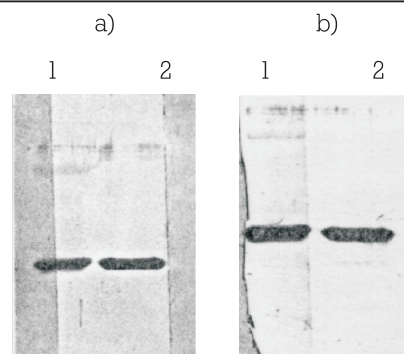
#### Primena MoAt 44 u imunoblotu

Imunoblot je metoda u kojoj su na najbolji način udružene rezolucija elektroforeze i specifičnost imunohemijske detekcije. Koristi se za karakterizaciju proteinskih antigena: utvrđivanje njihovog prisustva, određivanje relativne molekulske mase, kao i za njihovo izolovanje. Međutim, efikasnost imunoblota u najvećoj meri zavisi od prirode epitopa koji je prepoznat od strane antitela, zato što u elektroforezi, a posebno u elektroforezi sa najvećom rezolucijom, može doći do promene (denaturacije) proteinskih antigena. U tom slučaju se za Ag vezuju samo At koja prepoznaju denaturisane epitope Ag, tako da je uspešnost detekcije ovako izmenjenih antigena manja pri primeni MoAt koja ne reaguje sa denaturisanim antigenom, nego pri primeni poliklonskih antitela. U našem radu smo MoAt 44 koristili kao primarno At (nakon neredukcije i redukcije SDS-PAGE) i ispitivali smo njegovo vezivanje za izolovane IgG i IgM molekule, kao i za komercijalne ( $\kappa$ ) + ( $\lambda$ ) lance.

U imunoblotu je pokazano (slika 1) da MoAt 44 specifično reaguje sa  $\kappa$  lakim lancima imunoglobulina. Pored toga, MoAt 44 na neredukcionoj SDS-PAGE reaguje i sa IgG molekulima koji imaju  $\kappa$  tip lakih lanaca. Nakon što smo utvrdili da MoAt 44 reaguje sa  $\kappa$  lakim lancima, u redukcionalnoj SDS-PAGE na 10% gelu poredili smo ga sa komercijalnim anti- $\kappa$  antitelima. Kao uzorci su korišćeni IgG KB $\kappa$  i komercijalni  $\kappa$  lanac. Na slici 2 prikazan je blot paralelno razvijen sa komercijalnim anti- $\kappa$  antitelima i sa MoAt 44. U poređenju sa komercijalnim At dobijen je jači specifičan signal, praćen manjim nespecifičnim bojenjem.



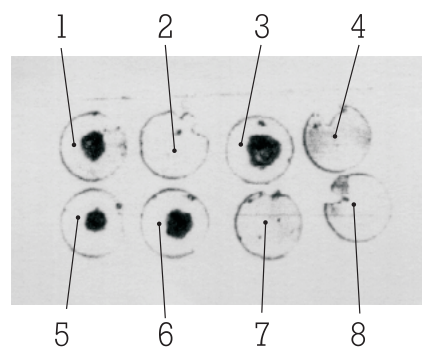
**Slika 1.** Imunoblot, reaktivnost MoAt 44 sa  $\kappa$  lancima nakon redukcione elektroforeze. Blot je razvijen sa BMoAt 44 (1 mg/ml) i STR-peroksidaza /NBT+BCIP. Uzorci: 1) IgM DJ - redukcioni uslovi, 2)  $\kappa$  laki lanac 3)  $\kappa$  + l, 4) Poliklonski IgG, 5) Poliklonski IgG - redukcioni uslovi, 6) IgG KB, 7) IgG KB - redukcioni uslovi



**Slika 2.** Poređenje osobina MoAt 44 i komercijalnog anti-  $\kappa$  antitela u imunoblotu. Blot je razvijen sa BMoAt 44 (1 mg/ml) i STR-peroksidaza/NBT+BCIP. a) razvijanje sa komercijalnim anti- $\kappa$  antitelima. Uzorci: 1) IgG KB 2)  $\kappa$  lanac b) razvijanje sa MoAt 44, Uzorci: 1) IgG KB 2)  $\kappa$  lanac

#### Primena MoAt 44 u dot-blotu

Dot-blot je kvalitativna metoda koja u novije vreme u potpunosti zamenjuje imunodifuziju, a služi za dokazivanje prisustva antigena ili antitela, u zavisnosti od reagensa koji je imobilisan na nitroceluloznu ili PVDF membranu. Osnovna prednost u odnosu na druge kvalitativne metode je izuzetna brzina kojom se dobija rezultat, a s obzirom da u najjednostavnijoj modifikaciji metode nije potrebna specijalizovana oprema, dot-blot test je pogodan za izvođenje u svim laboratorijama. MoAt 44 koristili smo kao primarno At za brzo određivanje tipa lakih lanaca u izolovanim IgG i IgM molekulima. Na slici 3 se vidi da je reakcija bila izrazito pozitivna kod Ig molekula sa  $\kappa$  lakim lancima, a potpuno negativna kod imunoglobulina sa  $\lambda$  lakim lancima. Kao kontrole su korišćeni komercijalni  $\kappa$  i  $\lambda$  lanci, kao i IgM i IgG molekuli sa ranije definisanim tipom lakih lanaca. Ova metoda mogla bi da se koristi u kliničkoj laboratorijskoj praksi u slučajevima kad je potrebno brzo određivanje tipa lakog lanca imunoglobulina.



**Slika 3.** Dot-blot sa BMoAt 44 na nitroceluloznu membranu, indikatorski sistem: STR-peroksidaza/OPD. Uzorci: 1) IgG KB 2) IgG MA 3) IgM RD 4) IgM DJ 5) IgG komercijalni 6) IgM komercijalni 7) IgM BR 8) kontrola-bez antigena

#### Primena MoAt 44 u imunofluorescenci

U testu imunofluorescence rađena je fenotipska karakterizacija limfocita slezine i periferne krvi pacijenta T. N. obolelog od viloznog limfoma. Pored uobičajenih antitela za B ćelijske markere CD19, CD22, CD5, CD10, sIg,  $\lambda$  i  $\kappa$  korišćeno je i naše MoAt 44 direktno obeleženo FITC-om. Rezultat dobijen sa MoAt 44 pokazivao je nešto nižu vrednost (71,9%) u odnosu na komercijalno anti- $\kappa$  antitelo (87,2%) što se može objasniti, budući da je komercijalno anti- $\kappa$  At poliklonsko i da može pre-



poznati i druge determinante eksprimirane na  $\kappa$  lancu. MoAt 44 korišćeno je za detekciju  $\kappa$  membranskog markera i kod drugih pacijenata i pri tom je pokazano da daje veoma dobre rezultate, te se može preporučiti za primenu i u ovoj metodi. Verovatno se MoAt 44 uspešno može primeniti i u imunofluorescenci na tkivnim presecima, kao i u imunohistohemijskom bojenju tkivnih preseka (sa vizuelizacijom koja je zasnovana na enzimskoj aktivnosti, a ne na fluorescenciji).

#### Primena MoAt 44 u dvosmernoj imunodifuziji (DID)

DID u gelu koristi se, kako za kvalitativnu, tako i za semikvantitativnu analizu. Iako najstarija imunoprecipitaciona metoda, DID je jos uvek nezamenljiva za jednostavno dokazivanje prisustva antigena u serumu i za analizu odnosa između dva antigena. DID-om smo testirali komercijalni IgG i IgM RD kao antigene. MoAt 44 precipitira komercijalni IgG (humani IgG sadrži 2/3  $\kappa$  lakog lanca) kao i IgM RD i to u uzorcima u kojima je koncentracija IgM-a bila najveća (1 i 0,5 mg/ml). Sa manjim koncentracijama (0,25, 0,125, 0,0625 mg/ml) nije pokazana vidljiva precipitacija.

#### Primena MoAt 44 u radijalnoj imunodifuziji (RID)

RID je jedna od standardnih metoda za merenje koncentracije različitih Ag u serumu. Zasniva se na imunoprecipitaciji u agaroznom gelu, u kome su inkorporirana PoAt ili MoAt. Da bismo proverili da li je primenljivo u RID, MoAt 44 je inkorporirano u agarozni gel u koncentraciji 20  $\mu$ g/ml. U pripremljene bazene uneta je serija dvostrukih razblaženja IgM RD u koncentracijama: 385, 193, 96, 48  $\mu$ g/ml. Nakon 72-časovne difuzije u vlažnoj komori gelovi su isprani, osušeni i precipitacioni prstenovi vizualizovani bojenjem sa CBB. Rezultat je prikazan na slici 4. Na osnovu prečnika precipitacionih prstenova i poznate koncentracije IgM RD unete u bazene konstruisali smo standardnu krivu radijalne imunodifuzije. Dobijena pravolinijska zavisnost ukazuje da je MoAt primenljivo u RID. Pokazano je da MoAt 44 u RID precipitira i IgM, IgA i IgG molekule sa  $\kappa$  lakim lancem.

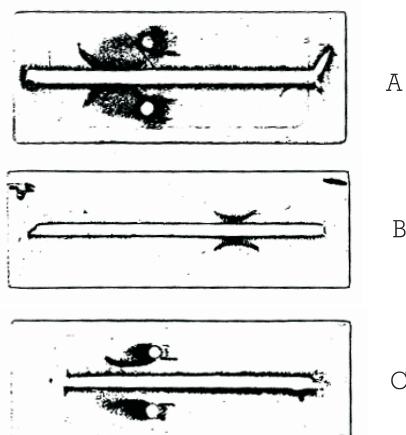


Slika 4. Radijalna imunodifuzija u sistemu MoAt 44-IgM RD

#### Primena MoAt 44 u imunoelktroforezi

Da bismo proverili da li je MoAt 44 primenljivo u imunoelktroforezi, najpre je urađena elektroforetska separacija antigena (pri 15V/cm, na 10°C, tokom 60 minuta). Normalni humani serum (NHS) se ovom metodom razdvaja na 5 glavnih elektroforetskih zona: albumin,  $\alpha_1$ -globulin,  $\alpha_2$ -globulin,  $\beta$ -globulin i  $\gamma$ -globulin. Nakon elektroforeze, u kanal paralelan pravcu prethodne separacije, unet je antiserum (MoAt 44). Vreme difuzije je bilo 15h, u vlažnoj komori. Nakon ispiranja i sušenja, precipitacione linije su vizuelizovane bojenjem sa

CBB. Rezultati imunoelktroforeze prikazani su na slici 5. Na slici 5a se vidi da MoAt 44 u imunoelktroforezi iz NHS-a precipitira IgM i IgG dok precipitacija IgA nije vidljiva, najverovatnije zbog toga što koncentracija MoAt 44 nije bila dovoljna da napravi vidljive precipitate sa  $\kappa$  tipom lakog lanca u okviru IgA, jer je i ukupna koncentracija IgA u ispitivanom NMS bila niska. Na slici 5b vidi se da MoAt 44 u imunoelktroforezi precipitira IgG (korišćen je IgG pacijenta KB koji ima multipli mijelom). Na slici 5c vidi se da MoAt 44 u imunoelktroforezi precipitira IgM TN (korišćen je IgM pacijenta sa Waldenström-ovom makroglobulinemijom, pri čemu je dobijen rezultat karakterističan za ovu bolest). Zapaža se smanjenje u dužini i intenzitetu  $\gamma$ G luka, odsustvo normalnog  $\gamma$ M luka, kao i prisustvo vrlo gustog precipitata blizu bazena sa antigenom na katodnoj strani.



Slika 5. Imunoelktroforeza a) u sistemu NHS-MoAt 44, b) u sistemu IgG KB-MoAt 44, c) u sistemu IgM TN-MoAt44

## ZAKLJUČAK

MoAt 44 dobijeno hibridomskom tehnologijom specifično prepoznaje humani  $\kappa$  lanac, kako slobodan, tako i u okviru IgG, IgA i IgM molekula. MoAt 44 najverovatnije je specifično za sekvencioni tip epitopa. Definitivnu potvrdu o prirodi epitopa 44 dobili bismo peptidnim mapiranjem.

Na osnovu naših rezultata, MoAt 44 precipitira IgM i IgG iz rastvora, a takođe pokazuje odlične precipitacione osobine u gelu. Detaljno je ispitana primenljivost MoAt 44 u većem broju najvažnijih imunohemijskih tehnika. MoAt 44 pokazuje odlične osobine u imunoblotu, dot blotu, imunofluorescenci, imunoprecipitacionim tehnikama, imunoelktroforezi. Na osnovu dobijenih rezultata, ovo MoAt možemo preporučiti kao reagens za istraživanje i imunodijagnostiku.

## ZAHVALNOST

Autori se zahvaljuju Slobodanu Živkoviću za izvanrednu tehničku pomoć prilikom izrade ovog rada.

The authors wish to thank to Mr. Slobodan Živković for his excellent technical assistance.

**LITERATURA**

1. Kohler G. and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497
2. Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol.* 1976; 6(7):511-9.
3. Karsten U, Widmaier R, Kunde D. Monoclonal antibodies against antigens of the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Arch. Geschwulstforsch.* 1983; 53 (6): 529-536
4. Anstee DJ, Edwards PA. Monoclonal antibodies to human erythrocytes. *Eur J Immunol.* 1982; 12(3): 228-32
5. Sonnenberg A, Kolvenbag GJ, Al EJ, Hilgers J. Molecular characterization of a membrane protein by a simple immunobinding procedure with monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1984; 72(2): 443-50.
6. Tracy R. P, Katzmann J. A, Kimlinger T.K et al. Development of monoclonal antibodies to proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65: 97-107
7. Parham P, Androlowicz M. J, Brodsky F. M et al. Monoclonal antibodies: purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens. *Journal of Immunological Methods* 1982; 53:133-177
8. Foon KA, Schroff RW, Bunn PA et al. Effects of monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1984; 64(5):1085-93.
9. Dilman R. O. Monoclonal antibodies for treating cancer. *Annual Intern. Med.* 1989; 11: 592-603
10. Neuberger N. S, Williams G. T, and Fox R.O. Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature* 1984; 13: 602
11. Aucouturier P, Preud homme J-L. Subclass distribution of human myeloma proteins as determined with monoclonal antibodies. *Immunol. Lett.* 1987; 16: 55-57
12. Pick A. I, The elusive antigen, *Acta haematol.* 1982; 68: 196-206
13. Merlini G, Aguzzi F and Whicher J, Monoclonal gammopathies. *Biotech Lab International* 1998; 3: 14-19
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1992; 24:145-9.